

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.04.12

埃博拉病毒分子生物学研究进展

孙英尧,董浩*

(吉林农业大学生命科学院,长春 130118)

[收稿日期] 2018-12-24 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280 (2019) 04-0077-04 [中图分类号]S852.65

[摘要] 埃博拉出血热是由埃博拉病毒所引起的高致死性传染病。40 多年来,埃博拉出血热疫情多次在非洲西部国家大规模爆发,造成了大量人员死亡与重大财产损失。为更好地认识埃博拉出血热,就埃博拉出血热的病原学、分子生物学等最新研究进展进行综述。

[关键词] 埃博拉出血热;埃博拉病毒;结构蛋白

Study Advance in Molecular Biology of Ebola Virus

SUN Ying-yao, DONG Hao*

(College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Corresponding author: DONG Hao, E-mail: donghao_jlau@163.com

Abstract: Ebola virus disease (EVD) is a mortal epidemic caused by Ebola virus (EBOV). Ebola virus disease has broken out for many times in several western African countries. It has resulted in a large number of deaths and major property losses. This paper reviewed the latest research progress in etiology and molecular biology of Ebola haemorrhagic fever for better understanding of Ebola haemorrhagic fever.

Key words: Ebola virus disease; Ebola virus; structural proteins

埃博拉病毒(Ebola virus, EBOV)是一种十分罕见的病毒,它是在 1976 年同时暴发的两起疫情中首次出现的,一起在现在的南苏丹恩扎拉,另一一起在刚果民主共和国扬布库。后者发生在位于埃博拉河附近的一处村庄,该病由此得名。感染埃博拉出血热(Ebola virus disease, EVD)通常潜伏期为 4~10 d,初期症状与流感类似,表现为呕吐与腹泻,随后身体内外出血,伴随有突发休克,最后是多器官衰竭。病人一般在出现症状后的 6~16 d 死亡。

尽管目前已研发了一些疫苗可对埃博拉病毒进行防护,但我们对埃博拉病毒的了解还不够。本文就埃博拉病毒的分子生物学研究进展作一综述,以期为更深入的研究提供参考。

1 埃博拉病毒的分类学地位

埃博拉病毒属于单股反意病毒目(Mononegavirales)丝状病毒科(Filoviridae)埃博拉病毒属(Ebolavirus)。该属又包含 5 个种:本迪布焦埃博拉病毒(Bundibugyo Ebolavirus, BEBOV)、雷斯顿埃博

基金项目:十三五国家重点研发计划(2017YFD0500802042)

作者简介:孙英尧,本科,从事病原微生物研究。

通讯作者:董浩。E-mail:donghao_jlau@163.com

拉病毒(*Reston Ebolavirus*, REBOV)、苏丹埃博拉病毒(*Sudan Ebolavirus*, SEBOV)、大森林型埃博拉病毒(*Tai Forest Ebolavirus*; *Ivory Coast Ebolavirus*, ICEBOV)、扎伊尔型埃博拉病毒(*Zaire Ebolavirus*, ZEBOV)。丝状病毒科下还有两个属,为马尔堡病毒(*Marburgvirus*, MAEV)与奎瓦病毒(*Cuevavirus*)^[1]。

2 埃博拉病毒分子生物学研究进展

埃博拉病毒(图 1)直径 80 nm,长度为 970~1200 nm,进入细胞后病毒的长度可达 14000 nm^[2]。埃博拉病毒的反义基因长达 19 kb,基因组呈线状,无分段,包含有 7 个基因与两个调节区段。两个调节区段位于 3' 头端与 5' 尾端。3' 头端有双向复制的启动子,也是第一个基因的转录起始位点。5' 尾端编码复制启动子的互补序列^[3]。7 个基因分别对应编码埃博拉病毒的 7 种病毒蛋白,分别为:核蛋白(nucleoprotein, NP)、糖蛋白(glycoprotein, GP)、L 聚合酶蛋白(L-polymerase protein, L)、病毒蛋白 24(viral protein24, VP24)、病毒蛋白 30(viral protein30, VP30)、病毒蛋白 35(viral protein35, VP35)与病毒蛋白 40(viral protein40, VP40)^[4]。7 种蛋白的分子生物学特征综述如下:

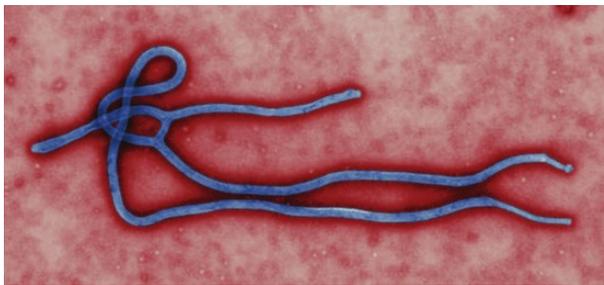


图 1 埃博拉病毒电镜照片^[5]

Fig 1 Electron microscope photography of Ebola virus^[5]

2.1 病毒蛋白 24(VP24) VP24 是丝状病毒的常见蛋白。以往的研究表明,该蛋白的功能是抑制宿主机体产生 α 、 β 与 γ 干扰素,阻碍干扰素基因的翻译过程。VP24 能够通过结合真核细胞核孔的核转运蛋白以及抑制 KappaB(NF-KB)通路来阻止编码干扰素基因的转录、信号转导与磷酸化过程^[6]。

VP24 也是病毒组装衣壳的重要蛋白,它增强了不同结构蛋白之间的协同催化作用。通过观察 C、N 末端缺失的 VP24,发现 N 末端编码的 VP24 具有调控衣壳蛋白形成的作用^[7],说明 VP24 在病毒衣壳合成过程中起的作用应该为催化作用或者为调控 VP35 与 NP。另有研究表明,VP24 与 VP40 的共同表达能够形成大量的类病毒粒子(VLPs),远比 VP40 单独表达时多得多,推测可能是 VP24 的小干扰 RNA(siRNA)降低了病毒的释放量,使大量的病毒蛋白保留在被感染的细胞内。此外还有研究表明,VP24 结合在 VP35 的病毒衣壳外表面,起到了调节 NP 层、增强衣壳机械强度稳定性的作用,增强了 NP、VP35、VP24 的协同关系^[8]。

2.2 病毒蛋白 35(VP35) VP35 的主要作用是影响宿主的免疫系统,使病毒免于被宿主的免疫机制清除。VP35 是 1 型干扰素的拮抗物,通过与双链 RNA 结合抑制干扰素调节因子 3,同时抑制 1 型干扰素 RIG-1 的信号传导从而降低 α 型与 β 型干扰素的生成^[9]。VP35 还能通过多种途径影响宿主整体的免疫系统。VP35 通过增加活跃的 STAT1(转录活化蛋白 1)调节干扰素调节因子 7 的活性,抑制干扰素生成 toll 样受体与 RIG-1 的活性。已有证据表明,VP35 还可以解除 RNA 沉默,可以使先天免疫信号传导与宿主的抗病毒反应失效^[10]。

此外,VP35 也有协助病毒复制的功能。VP35 的 C 末端可以结合双链 RNA,而 N 末端可以结合 NP。当 VP35 的 N 末端与 NP 解离时,NP 会活化,随后与病毒 RNA 结合,高度激活基因组的转录活性,随后的 NP 解离,并出现寡聚现象,形成寡聚 NP。但 NP 单体并没有寡聚的倾向,仅在上述的生化反应中才会出现寡聚。此外,其他病毒中 VP35 与 NP 的作用反而会降低 NP 的寡聚化。对这一现象的研究可能是研发治疗埃博拉出血热的突破口。

2.3 病毒蛋白 30(VP30) VP30 是埃博拉病毒的一种次要核蛋白质,主要作用是起始病毒基因组的转录,并调节细胞的动态磷酸化过程^[11]。最新的报道发现,VP30 还具有解除 RNA 干扰的功能,但是具体机制尚不明确。当存在 siRNA 时,VP30 会

影响主要参与 RNA 干扰的蛋白的帽子结构,这时即使是 VP35 的 N 末端 RNA 结合域已经结合,但 VP30 的干涉仍会启动。这表明 VP30 蛋白的 RNA 结合功能非常广泛,而且不局限于宿主或者病毒自身的 RNA,似乎存在一定的碱基结构选择性,但是这一功能是否为病毒 RNA 转录所必须的,目前尚不可知。

2.4 病毒蛋白 40(VP40) VP40 是病毒组装的基石^[12],其主要作用是形成六聚物——这一结构被认为是埃博拉病毒衣壳的基础结构,功能为埃博拉基因组复制与 RNA 的结合^[13]。

以往的研究多针对于该蛋白作用调节生成 VLPs,而最近的研究表明,VP40 还可以产生外泌体结构,杀死免疫细胞。外泌体的出现一般是在病毒感染细胞之后,VP40 导致的外泌体接触到未成熟的 T 细胞和单核白血球细胞后,会引起这两者的凋亡及活性下降。关于 VP40 在致病机制中的作用,有可能是开发新治疗手段的切入点。已有研究用酪氨酸磷酸激酶对其进行酪氨酸残基加聚磷酸基团,降低 VP40 的活性。还有使用氧四环素作为其他治疗手段^[4],它可以导致 VP40 相关的分泌小体减少,并显著降低接受了分泌小体的受体细胞的生存能力,这一成果对治疗埃博拉出血热有着很大的研发空间。

2.5 糖蛋白(GP) GP 是埃博拉病毒蛋白中最主要的毒性蛋白。GP 并非指单独的 GP 糖蛋白,而是由编码 GP 基因经过转录编辑形成的三种产物的总称:其包括全长的 GP 蛋白(包含 GP1 受体结合域,GP2 病毒融合域两个亚基);可溶性 GP(sGP,缺少横跨膜域)与小可溶 GP(ssGP)。sGP 上存在福林酶位点,经过福林酶处理后的 sGP 可以产生一个碎片片段称为 Δ -肽^[14]。

GP 与病毒感染细胞的途径密切相关。通过 GP 介导的胞饮作用,GP 会将病毒与宿主细胞的前溶酶体结构相融合,促使病毒进入细胞。在毒性方面,GP 通过黏蛋白类似域影响细胞的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路,降低了 ERK2 的磷酸化作用与催化活性,降低宿主细胞的粘附性,使细胞剥

离且不能维持正常的球形,继而使细胞死亡^[15]。此外,sGP 的碎片产物 Δ -肽有可能还扮演着埃博拉病毒致病机理中病毒孔蛋白的作用,其可以在哺乳动物的原生质膜上形成孔道,增加离子通透性,破坏细胞的内环境平衡^[16]。

GP 作为位于病毒衣壳表面的蛋白,与埃博拉病毒的侵染选择性也有很深的渊源。在 2014-2016 年的西非埃博拉出血热爆发中,检测到的埃博拉病毒的 GP 蛋白在 A82V 中的高频变异。这一变异增加了 GP 的膜融合活性,并且使得大量其他型的细胞变得可以被侵染:包括黑猩猩的纤维母细胞(S008842)、恒河猴上皮细胞(FRHK4)、非洲绿猴上皮细胞(Vero)以及人树突细胞。这一信息表明新种埃博拉病毒已经开始高度适应人类作为宿主^[17-18]。

2.6 核蛋白(NP) NP 是埃博拉病毒的复制循环中的重要蛋白——核糖核蛋白复合物的亚基,其主要功能是保护病毒 RNA 免于被降解,保证病毒基因组在装配过程中正确进入到病毒粒子的衣壳中。目前 NP 的新功能并没有发现。

2.7 聚合酶蛋白(L) L 是依赖 RNA 的 RNA 聚合酶,是病毒多聚酶复合物的元件之一。主要功能是病毒的转录与复制过程中对病毒 RNA 进行反转录与翻译,但是 L 作为一种病毒的 RNA 聚合酶,其功能与真核细胞的 RNA 聚合酶差异很大。以 GP 基因为例子,L 将其翻译的结果是 sGP 而不是 GP^[19]。L 的翻译也是实现调节 GP、sGP、ssGP 不同水平的原因。在连续培养的组织细胞中,L 被发现能够在 GP 基因中连续的 7 个 U 中再添加一个 U,从而调节 GP 与 sGP 的表达比率为 80:20。在豚鼠的实验中,该基因回复突变再次使这个基因又变回了 7 个 U,导致 GP:sGP=20:80^[20]。这一特点有可能是病毒进行免疫回避的一种独特手段。作为对比,在人的肝癌细胞系(Hun7)中的病毒复制则是一个该基因为 9U 的变异体,其保持了高水平的 sGP 表达,同时增强的还有 ssGP 的表达。通过豚鼠与人肝癌细胞的两个实验中不难发现 L 除了翻译的功能之外,还存在有调节 GP 与 GP 相关蛋白比例的功能。这一现象据推测可能与病毒为了适

应不同的宿主而进行的调节有关,从而实现在宿主体内的快速复制。

3 结 语

埃博拉出血热目前尚无有效的治疗手段。对埃博拉疫苗的研究始于 2004 年,由美国卫生与公众服务部(State Department of Health and Human Services)发起的 Project Bioshield,最终于 2014 年推出了能够 100%保护的疫苗,这为后来的埃博拉病毒疫苗提供了模板。随后的口腔炎病毒(rVSV)与扎伊尔埃博拉病毒(ZEBOV)糖蛋白的重组病毒(rVSV-ZEBOV)疫苗在 2016 年的埃博拉疫情中效果显著,但是仍然有患者在痊愈后 1~2 年中抗体显著下降,有着复发的潜在危险^[21]。目前来看,针对埃博拉出血热的疫苗开发形式仍然严峻。

参考文献:

- [1] Zawilińska B, Kosz-Vnenchak M. General introduction into the Ebola virus biology and disease[J]. *Folia Med Cracov*, 2014, 54(3): 57-65.
- [2] Geisbert T W, Jahrling P B. Differentiation of filoviruses by electron microscopy[J]. *Virus Res*, 1995, 39(2/3): 129-150.
- [3] Schlereth J, Grünweller A, Biedenkopf N, et al. RNA binding specificity of Ebola virus transcription factor VP30[J]. *RNA Biol*, 2016, 13(9): 783-798.
- [4] Cantoni D, Rossman J S. Ebolaviruses: New roles for old proteins[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018, 12(5): e0006349.
- [5] Murray M J. Ebola virus disease: a review of its past and present[J]. *Anesth Analg*, 2015, 121(3): 798-809.
- [6] Reid S P, Leung L W, Hartman A L, et al. Ebola virus VP24 binds karyopherin alpha and blocks STAT1 nuclear accumulation[J]. *J Virol*, 2006, 80(11): 5156-5167.
- [7] Han Z, Boshra H, Sunyer J O, et al. Biochemical and functional characterization of the Ebola virus VP24 protein: implications for a role in virus assembly and budding[J]. *J Virol*, 2003, 77(3): 1793-1800.
- [8] Beniac D R, Melito P L, DeVarenes S L, et al. The organisation of Ebola virus reveals a capacity for extensive, modular polyploidy[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7: e29608.
- [9] Basler C F, Wang X, Muhlberger E, et al. The Ebola virus VP35 protein functions as a type I IFN antagonist[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(22): 12289-12294.
- [10] Haasnoot J, De Vries W, Geutjes E J, et al. The ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing[J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(6): e86.
- [11] Modrof J, Muhlberger E, Klenk H D, et al. Phosphorylation of VP30 impairs Ebola virus transcription[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(36): 33099-33104.
- [12] Ruigrok R W, Schoehn G, Dessen A, et al. Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus[J]. *J Mol Biol*, 2000, 300(1): 103-112.
- [13] Bornholdt Z A, Noda T, Abelson D M, et al. Structural rearrangement of Ebola virus vp40 begets multiple functions in the virus life cycle[J]. *Cell*, 2013, 154(4): 763-774.
- [14] Mehedi M, Falzarano D, Seebach J, et al. A new Ebola virus nonstructural glycoprotein expressed through RNA editing[J]. *J Virol*, 2011, 85(11): 5406-5414.
- [15] Zampieri C A, Fortin J-F, Nolan G P, et al. The ERK mitogen-activated protein kinase pathway contributes to Ebola virus glycoprotein-induced cytotoxicity[J]. *J Virol*, 2007, 81(3): 1230-1240.
- [16] He J, Melnik L I, Komin A, et al. Ebola virus delta peptide is a viroporin[J]. *J Virol*, 2017, 91(16): e00438-17.
- [17] Urbanowicz R A, McClure C P, Sakuntabhai A, et al. Human adaptation of Ebola virus during the West African outbreak[J]. *Cell*, 2016, 167(4): 1079-1087.
- [18] Dietzel E, Schudt G, Kra'hling V, et al. Functional characterization of adaptive mutations during the West African Ebola virus outbreak[J]. *J Virol*, 2017, 91(2): e01913-16.
- [19] Volchkov V E, Becker S, Volchkova V A, et al. GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases[J]. *Virology*, 1995, 214(2): 421-430.
- [20] Volchkova V A, Dolnik O, Martinez M J, et al. Genomic RNA editing and its impact on Ebola virus adaptation during serial passages in cell culture and infection of Guinea pigs[J]. *J Infect Dis*, 2011, 204(Suppl 3): S941-S946.
- [21] Bornholdt Z A, Bradfute S B. Ebola virus vaccination and the longevity of total versus neutralising antibody response - is it enough? [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(7): 699-700.

(编辑:李文平)